基础研究

膜联蛋白A1蛋白在异丙酚对脓毒症大鼠肠保护作用中的机制

陈 茜,赵天云,郭小花,潘永英,刘文兴,宋兴荣
广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心麻醉科,广东 广州 510623

摘要:目的 观察膜联蛋白A1(Annexin A1)蛋白在异丙酚对脓毒症大鼠肠保护作用中的机制。**方法** 采用大鼠股静脉注射脂多糖复制脓毒症模型,按完全随机化原则分为6组:正常对照组、内毒素组、异丙酚组、脂肪乳组、内毒素+异丙酚组、内毒素+脂肪乳组。酶联免疫吸附法(ELISA)检测肠组织中肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素-1(IL-1β)、白细胞介素-1(IL-6)的表达;Western blot检测肠组织中Annexin A1表达;HE染色比较各组肠组织形态。**结果** 与对照组相比,脂多糖组IL-1β,IL-6,TNF-α表达明显升高,Annexin A1表达明显降低;脂多糖+异丙酚组IL-1β,IL-6,TNF-α表达明显降低,Annexin A1表达明显升高(P<0.05)。**结论** 异丙酚对脓毒症大鼠肠道有明显的保护和抗炎作用,且该作用可能与膜联蛋白A1蛋白相关。

关键词:脓毒症;异丙酚;膜联蛋白A1

Mechanism of Annexin A1 protein in the protective effect of propofol on sepsis in rats

CHEN Xi, ZHAO Tianyun, GUO Xiaohua, PAN Yongying, LIU Wenxing, SONG Xingrong
Department of Anesthesiology, Women and Children's Medical Center Affiliated to Guangzhou Medical College, Guangzhou 510623, China

Abstract: Objective To investigate the protection of Annexin A1 on the injury of intestinal protective effect of propofol in rats with sepsis. **Methods** Sepsis of rat model was induced by injection of lipopolysaccharide in rat femoral vein. The rats were randomized to 5 groups: normal control group(Group C), LPS group(Group L), propofol group(Group P), LPS+Propofol group (Group L+P), Intralipid group(Group I), LPS+Intralipid group(Group L+I). The intestinal tissue in each group were stained with hematoxylin and eosin(HE) and examined under microscope. The expression of tumor necrosis factor(TNF-α), interleukin1(IL-1) and leukocyte mediated endothelin-1(IL-6) on intestinal tissue were detected by ELISA. Western blot was used to detect the expression of Annexin A1. **Results** Compared with the control group, the expression of IL-1, IL-6, TNF-α was significantly increased, the Annexin A1 was obviously decreased in group L, while the opposite in group L+P. **Conclusion** Propofol may have protective and anti-inflammatory effects on the intestinal tract of rats with sepsis, and the effect may be correlated with the Annexin A1.

Key words: spesis; propofol; Annexin A1

脓毒症是临床危重患者常见的严重并发症之一,而肠道是脓毒症发生的中心器官[1],保护肠道黏膜的屏障功能在脓毒症的治疗过程中至关重要[2]。异丙酚是一种短效、快速的静脉全麻药,除了它本身的麻醉作用外,还具有强大的抗炎作用[3-5]。前期实验已证实异丙酚可通过上调膜联蛋白A1(Annexin A1)的表达从而抑制炎症反应。而近年来有研究表明:在炎症时,肠组织可分泌Annexin A1,并推测其可能参与了肠炎症损伤的修复[6-8]。本研究的前期实验是从血液中的单核细胞入手,但异丙酚对肠炎性疾病是否具有保护作用,其抗炎机制是否通过肠组织Annexin A1调控尚未可知,因此研究拟探讨异丙酚通过调控肠上皮细胞Annexin A1蛋白在脓毒症中的抗炎作用及其机制,为临床肠炎性疾病手术的麻醉药物选择和麻醉方式选择提供新的思路,也为今后异丙酚应用于临床危重患者提供有效的胃肠保护奠定坚实的基础。

收稿日期:2016-06-16
基金项目:广东省自然科学基金(S2013040016969);广东省人口和计划生育委员会科研项目(20133083)
作者简介:陈 茜,博士,主治医师,E-mail: catherinecham@163.com
通信作者:宋兴荣,硕士,主任医师,E-mail: songxr1966@sohu.com

1 资料与方法

1.1 实验动物及分组

36只雄性SD大鼠,体质量180~220 g,均禁食过夜,用乌拉坦(1.0 g/kg)肌肉注射麻醉后,行右侧股静脉插管建立静脉输液通道。将36只SD大鼠采用随机数字法将大鼠随机分为对照组、内毒素组、异丙酚组、脂肪乳组、内毒素+异丙酚组、内毒素+脂肪乳组,每组6只。

1.2 动物模型建立及用药

按照以下分组要求注射药物:正常对照组,注射0.9%生理盐水;脂多糖组,注射脂多糖10 mg/kg;脂多糖+异丙酚组,注射LPS 10 mg/kg和丙泊酚5 mg/kg,继以丙泊酚10 mg/(kg·h)的速度使用微泵持续静脉泵注至6 h;脂肪乳组,注射0.9%生理盐水,继以10%脂肪乳

10 mg/(kg·h)的速度使用微泵持续静脉泵注至6 h;异丙酚组,注射0.9%生理盐水,继以丙泊酚10 mg/(kg·h)的速度使用微泵持续静脉泵注至6 h;脂肪乳+内毒素组,注射LPS 10 mg/kg,继以10%脂肪乳10 mg/(kg·h)的速度使用微泵持续静脉泵注至6 h。

1.3 检测方法

取大肠组织制备石蜡切片,行HE染色。血清检测:肠道黏膜组织匀浆后分别用于ELISA检测TNF-α、IL-1β、IL-6的浓度。Western Blot检测:使用含有1%蛋白酶抑制剂混合物的RIPA蛋白裂解液裂解组织10 min,4 ℃ 12 000 *g* 离心,取上清,获取总蛋白样本。将总蛋白样本与上样缓冲液混匀,煮沸5 min后上样。采用12%的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,并转膜,电泳和转膜均使用BIO-RAD Western blot系统。将膜使用5%脱脂奶室温封闭1 h。分别使用兔抗大鼠Annexin A1抗体,兔抗大鼠β-actin抗体4 ℃孵育过夜。接着使用PBST洗涤3次,除去未结合的一抗。HRP标记的二抗孵育条带2 h,洗涤后滴加ECL显色液,在暗室中显影、定影,分析各组目的蛋白的条带。

1.4 统计学处理

计数数据以均数±标准差表示,采用SPSSl3.0软件进行分析,多组间均数比较采用单因素方差分析,两组间均值比较采用LSD检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大肠组织HE染色

结果显示脓毒症组大鼠结肠固有膜内弥漫性淋巴细胞、浆细胞、单核细胞等细胞浸润,大量中性粒细胞浸润发生在固有膜、隐窝上皮、隐窝内及表面上皮。与之相反,正常对照组和内毒素+异丙酚组大鼠肠黏膜则未见明显异常(图1)。

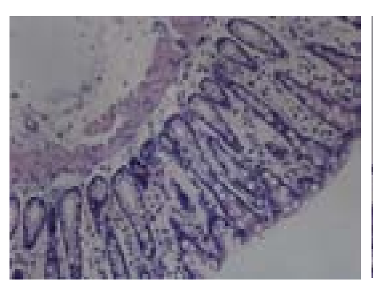
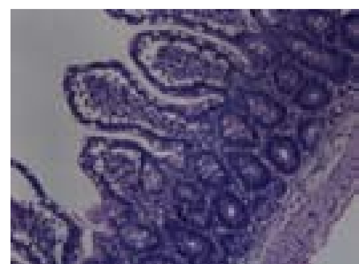




图1 大肠组织HE染色结果
A: 对照组; ***B***: 内毒素组; ***C***: 内毒素+异丙酚组.

2.2 炎症因子在各组的表达

与对照组相比,内毒素组TNF-α,IL-6,IL-1β表达明显升高;与内毒素组相比,内毒素+异丙酚组TNF-α,IL-6,IL-1β表达明显降低;与内毒素组相比,内毒素+脂肪乳组TNF-α,IL-6,IL-1β表达明显降低,但仍显著高于内毒素+异丙酚组($P<0.05$,图2~4)。

2.3 Annexin A1蛋白在各组中的表达

与内毒素组相比,异丙酚组和内毒素+异丙酚组的Annexin A1表达均明显升高($P<0.05$);其余各组Annexin A1表达与对照组无明显差异($P>0.05$,图5)。

3 讨论

Taniguchi等[9]研究发现,注射LPS能引起TNF-α、IL-6和IL-10的升高,同时能升高IL-6对IL-10的比值,应用异丙酚后TNF-α、IL-6和IL-10水平降低。Hsu等[10]研究发现单独应用异丙酚同生理盐水对照组相比,细胞因子水平并没有明显变化,但异丙酚对内毒素刺激引起的TNF-α、IL-1β、IL-6升高起抑制作用,可见异丙酚对无刺激时的细胞因子分泌没有影响,但对内毒素刺激引起的细胞因子升高起抑制作用。此外Chen等[11]用RT-PCR发现同事应用异丙酚组TNF-α、IL-1β、IL-6的mRNA水平比LPS刺激组低,可见异丙酚抑制炎症因子发生在翻译前水平。而本实验选取促炎症细胞因子IL-1β,IL-6,TNF-α等进行了检测,结果显示异丙酚可以明显减少促炎因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)的释放,说明异丙酚具有抗炎作用,这与上述既往文献报道异丙酚的抗炎作用是一致的。此外HE染色结果显示:给予异丙酚处理的脓毒症大鼠肠组织损伤比未用异丙酚处理明显减轻很多,提示异丙酚对脓毒症大鼠肠组织有明显的保护作用,为异丙酚的抗炎作用提供病理支持。

Annexin A1是膜钙蛋白家族中的一员,是一个重要的炎症调控蛋白。早期人们对Annexin A1抗炎作用主要集中在炎症包上(中性粒细胞、单核细胞等)[12]。近年来有学者发现在体内、体外诱导产生结肠炎时,肠粘膜组织也可分泌Annexin A1,并对其具体的调控机制进行了初探[13]。有文献报道,Annexin A1对肠粘膜损伤具有保护作用,且这种保护作用可能是通过其受体FPR2/ALX介导的,Annexin A1通过激活其受体可抑制白细胞的功能和促进胃粘膜伤口的愈合[14]。尽管如此,目前人们对Annexin A1在调节胃肠损伤和炎症方面的

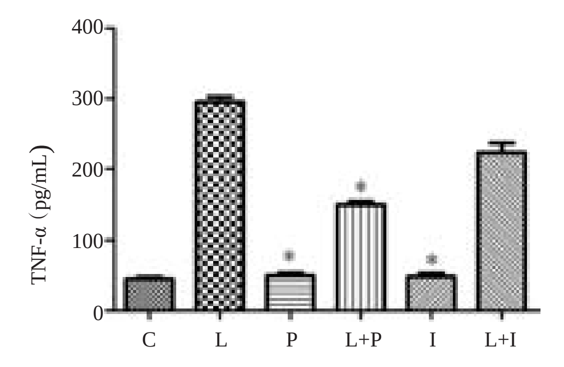


图2 TNF-α在不同组别大鼠肠组织的表达

C: 对照组; L: 内毒素组; P: 异丙酚组; I: 脂肪乳组L+P: 内毒素+异丙酚组; L+I: 内毒素+脂肪乳组. *P<0.05 *vs* 内毒素组.

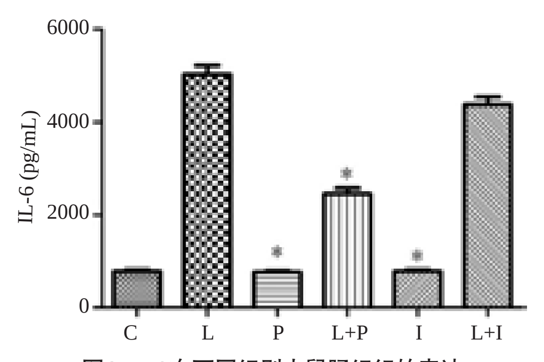


图3 IL-6在不同组别大鼠肠组织的表达

C: 对照组; L: 内毒素组; P: 异丙酚组; I: 脂肪乳组 L+P: 内毒素+异丙酚组; L+I: 内毒素+脂肪乳组. *P<0.05 *vs* 内毒素组

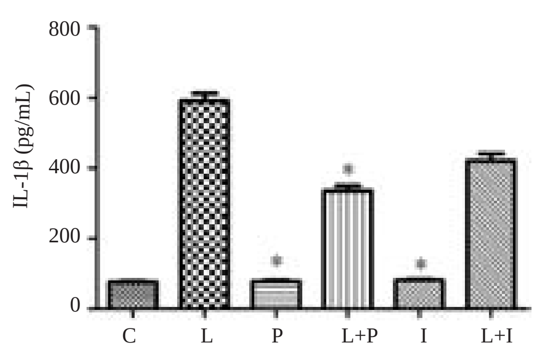


图4 IL-1β在不同组别大鼠肠组织的表达

C: 对照组; L: 内毒素组; P: 异丙酚组; I: 脂肪乳组L+P: 内毒素+异丙酚组; L+I: 内毒素+脂肪乳组.*P<0.05 *vs* 内毒素组.

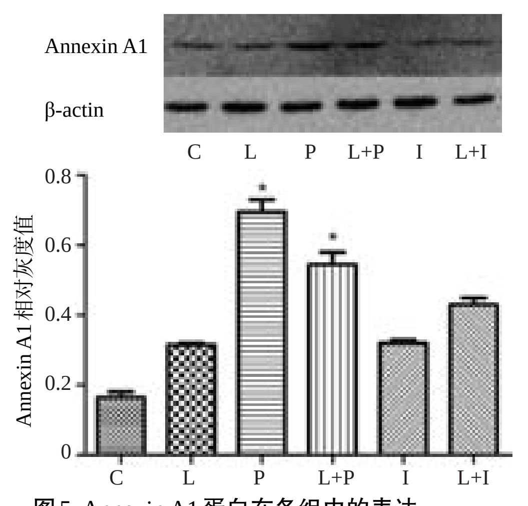


图5 Annexin A1蛋白在各组中的表达

C: 对照组; L: 内毒素组; P: 异丙酚组; I: 脂肪乳组 L+P: 内毒素+异丙酚组; L+I: 内毒素+脂肪乳组.* P<0.05 *vs* 内毒素组.

研究甚少。本研究初步证实异丙酚可能通过上调脓毒症大鼠模型肠组织Annexin A1蛋白的表达抑制炎症反应,但该作用是否通过其受体FPR2/ALX介导以及其上下游的调控机制等还需要下一步实验证实。

综上所述,本实验证实了异丙酚对脓毒症大鼠肠道有明显的保护和抗炎作用,且该作用可能与上调肠上皮组织Annexin A1蛋白表达有关,但其具体分子机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Sen V, Uluca U, Ece A, et al. Role of ankaferd on bacterial translocation and inflammatory response in an experimental rat model of intestinal obstruction[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(9): 2677-86.

[2] 冯文涛, 蔡文君, 沙圆圆, 等. 脓毒症胃肠道功能紊乱的中西医治疗概况[J]. 中国中医急症, 2015, 24(9): 1583-6.

[3] 赵艾华, 申军梅, 张兵慧, 等. 肥胖因素对异丙酚镇静效力的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(11): 1368-9.

[4] 支琳琳, 袁治国. 异丙酚对内毒素诱导大鼠肾小球血管内皮细胞VEGF受体2表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(4): 499-502.

[5] 邹 毅, 赵 晶, 邢丽娇, 等. 异丙酚对哮喘小鼠气道高反应性和气道炎症的调节作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(3): 334-7.

[6] Gavins FN, Hickey MJ. Annexin a1 and the regulation of innate and adaptive immunity[J]. Front Immunol, 2012, 3(3): 354-8.

[7] Perretti M, D'acquisto F. Annexin a1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(1): 62-70.

[8] Zhang P, Li Y, Zhang LD, et al. Proteome changes in mesenteric lymph induced by sepsis[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(6): 2793-804.

[9] Taniguchi T, Kanakura H, Takemoto Y, et al. Effects of ketamine and propofol on the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 during endotoxemia in rats[J]. Tohoku J Exp Med, 2003, 200(2): 85-92.

[10] Hsu BG, Yang FL, Lee RP, et al. Effects of post-treatment with low-dose propofol on inflammatory responses to lipopolysaccharide-induced shock in conscious rats[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2005, 32(2): 24-9.

[11] Chen RM, Chen TG, Chen TL, et al. Anti-inflammatory and antioxidative effects of propofol on lipopolysaccharide-activated macrophages[J]. Ann NY Acad Sci, 2005, 1042(5): 262-71.

[12] Renshaw D, Montero MT, Dalli JA, et al. Downstream gene activation of the receptor ALX by the agonist annexin a1[J]. PLoS One, 2010, 5(9): el2771-7.

[13] Barrientos VR. Mar SM,Morales GC, et al. Prolonged sedation of critically ill patients with midazolam or propofol:impact on weaning and costs[J]. Crit Care Med, 1997, 25(1): 33-40.

[14] Martin GR, Perretti M, Flower RJ, et al. Annexin-1 modulates repair of gastric mucosal injury[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(3): G764-9.